

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 327 682 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
16.07.2003 Patentblatt 2003/29

(51) Int Cl.7: C12N 15/10, C12N 15/11,
C12P 19/34

(21) Anmeldenummer: 02000720.9

(22) Anmeldetag: 11.01.2002

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU

MC NL PT SE TR

Benannte Erstreckungsstaaten:

AL LT LV MK RO SI

(71) Anmelder: BioSpring Gesellschaft für
Biotechnologie mbH
60386 Frankfurt (DE)

(72) Erfinder:

- Aygün, Hüseyin
60322 Frankfurt am Main (DE)

- Kircher, Markus, Dr.
60318 Frankfurt am Main (DE)
- Rosmus, Susann, Dr.
60318 Frankfurt am Main (DE)
- Wojczewski, Sylvia, Dr.
65812 Bad Soden (DE)

(74) Vertreter: Keller, Günter, Dr. et al
Lederer & Keller
Patentanwälte
Prinzregentenstrasse 16
80538 München (DE)

(54) Verfahren zur Herstellung von DNA

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von DNA, das umfasst, daß man n einzelsträngige Basis-DNA-Oligonukleotide bereitstellt, die unmittelbar aufeinanderfolgende Teile der Nukleotidsequenz der herzustellenden DNA sind, wobei das zweite bis n-te Basis-DNA-Oligonukleotid am 5'-Ende phosphoryliert ist und n wenigstens 2 ist; wenigstens (n-1) einzelsträngige Scharnier-DNA-Oligonukleotide bereitstellt, die als Ligationsmatrize für die Basis-DNA-Oligonukleotide fungieren können; die Basis-DNA-Oligonukleotide mit den Scharnier-DNA-Oligonukleotiden in

Kontakt bringt; das daraus resultierende DNA-Hybrid einer Ligationsreaktion unterwirft; und schließlich das daraus hervorgehende Reaktionsprodukt einer Exonukleasereaktion unterwirft, wobei der durch ligierte Basis-DNA-Oligonukleotide gebildete DNA-Strang des Reaktionsprodukts wenigstens zwei Cap-Strukturen umfaßt. Die Erfindung betrifft auch durch das Verfahren erhältliche DNA sowie ein Kit zur Durchführung des Verfahrens.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren auf dem Gebiet der Nukleinsäuresynthese. Derzeit gibt es zahlreiche Verfahren zur Synthese von einzelsträngiger bzw. doppelsträngiger DNA (vgl. Figur 1A und 1B).

5 [0002] Die einfachste Art einer Einzelstrangsynthese besteht im chemischen Aufbau einzelsträngiger DNA. Entsprechend kann auch doppelsträngige DNA generiert werden, indem nach chemischer Synthese von Strang (+) bzw. Gegenstrang (-) eine Hybridisierung beider Stränge durchgeführt wird. Diese Technik stößt jedoch sehr schnell an ihre Grenzen. Mit den Standardverfahren der DNA-Synthese können selten Längen von über 150 Basen aufgebaut werden. Hinzu kommen Abbrüche und Verkürzungen, die sich nur über sehr aufwendige Reinigungsverfahren (Gelelektrophorese) wirkungsvoll von dem Hauptprodukt abtrennen lassen.

10 [0003] Die Vervollständigung einzelsträngiger DNA zu einem Doppelstrang lässt sich auch auf enzymatischem Weg realisieren. Hierbei können beispielsweise Außenprimer verwendet werden, die gezielt den Zwischenbereich in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifizieren. Bei einer anderen Technik werden längere Oligonukleotide an ihrem 3' Ende mit Hairpinmustern ausgestattet, die sich selbstkomplementär zusammenlagern und damit als "intramolekularer" Primer für eine enzymatische Verlängerung dienen (Uhlmann, 1987; siehe auch Figur 1B, Nr. 8).

15 [0004] Längere Oligonukleotide sind auch die Grundlage einer weiteren Technik, bei der vollständig überlappende Oligonukleotide, also ein Doppelstrang, mittels spezifischer Primer in einer PCR aufgefüllt werden (Ciccarelli, 1991; siehe auch Figur 1B, Nr. 9).

20 [0005] Die Verwendung der bisher beschriebenen Techniken wird jedoch durch die Länge der eingesetzten Oligonukleotide eingeschränkt. Eine Erweiterung der Gensynthese auf größere Genabschnitte kann durch den Aufbau von sogenannten Genkassetten erreicht werden (US 4 652 639, US 6 083 726; siehe auch Figur 1A, Nr. 1 und 2). Solche Genkassetten bestehen aus kurzen, doppelsträngigen DNA Fragmenten, die entweder spezifische Überhänge von 3 bis 7 Basen (sticky end) oder auch glatte Enden (blunt end) mit 5' Phosphatgruppen tragen können. Überhänge haben dabei den Vorteil, dass durch eine definierte Auswahl solcher bei einer enzymatischen Ligation mehrere Fragmente gleichzeitig zu einem Gen kombiniert werden können. Der Aufbau dieser Kassetten erfolgt wiederum über Einzelstrangsynthese mit anschließender Hybridisierung von Strang (+) und Gegenstrang (-). Die 5' Phosphatgruppen werden vor Hybridisierung über Nukleotidkinasen an das Oligonukleotid angehängt. Durch die geringe Ligationseffizienz ist man bei der Verwendung einer solchen Strategie häufig auf eine Zwischenklonierung einzelner Genfragmente angewiesen (Ferretti, 1986). Zudem bereitet bei einer solchen Technik der Einsatz von degenerierten Oligonukleotiden, beispielsweise zum Aufbau von DNA Bibliotheken, große Schwierigkeiten.

25 [0006] Einfacher sind Reaktionen, die sequentielle Verlängerungstechniken auf PCR-Basis einsetzen (Ausubel, 1994; Jayaraman, 1991; Chang, 1993; Dillon, 1990; Jayaraman, 1992; Ye, 1992). Hierzu gehört beispielsweise eine Synthesetechnik, die 1997 von Casimiro beschrieben wurde (Casimiro, 1997; siehe auch Figur 1B, Nr. 12). In dieser Technik wird sukzessive doppelsträngige DNA generiert, indem lange einzelsträngige Oligonukleotide mit komplementären Enden über PCR amplifiziert werden und somit als Matrizen ("templates") für verlängernde PCR-Reaktionen dienen können. Ein wesentlicher Nachteil einer solchen Strategie besteht in der Akkumulation von Mutationen durch die Verwendung zu hoher Zyklenzahlen in der PCR. Bei der rekursiven Gensynthesestrategie (Dillon, 1990; Ausubel, 1994; Traub, 2001; siehe auch Figur 1B, Nr. 10) werden die zu synthetisierenden Gene als zueinander versetzt überlappende, Strang (+) und Gegenstrang (-) Oligonukleotide aufgebaut. In einer anschließenden PCR können die freien 3'-Enden solcher Oligonukleotide als Primer zur Synthese des komplementären Strangabschnittes eingesetzt werden. Da sich nach jeder Verlängerung wieder neue Anlagerungsmöglichkeiten für flankierende Sequenzen ergeben, lassen sich so Zyklus-für-Zyklus vollständige Gene synthetisieren. In einer etwas abgewandelten Form, kommt diese Strategie auch bei einem anderen Verfahren zum Einsatz. Hier verzichtet man auf die Verwendung besonders langer Oligonukleotide zur Verlängerung des Gens und arbeitet stattdessen mit kleineren Übergangsstücken, die die einzelnen Genfragmente miteinander verbinden. Diese Übergangsstücke fungieren gleichzeitig in der PCR als Primer, die den komplementären Gegenstrang entsprechend aufbauen (Yayaraman, 1992; siehe auch Figur 1A, Nr. 11). Genau wie bei Casimiro (Casimiro, 1997), besteht auch hier ein wesentlicher Nachteil in der Akkumulation von Mutationen durch die Verwendung zu hoher Zyklenzahlen in der PCR. Weiterhin verhindern die einzelnen doppelsträngigen Fragmente eine effiziente Amplifikation des Vollängenproduktes, da sie bedingt durch Ihre Länge bei wesentlich höheren Temperaturen mit der Matrize hybridisieren als die PCR-Außenprimer.

30 [0007] In wiederum anderen Gensynthesestrategien steht der Einsatz von Ligasen im Vordergrund (Sproat, 1985; Ferretti, 1986; Hostomsky, 1987; Wosnick, 1989; Climie, 1990; Oprian, 1991). Bei der TDL-Technologie ("template directed ligation") werden Oligonukleotide mit 5'-Phosphatgruppen an einen bereits vorhandenen Einzelstrang hybridisiert und anschließend enzymatisch zu Oligonukleotidpolymeren verknüpft (WO 0058517, US 6 110 668; siehe auch Figur 1A, Nr. 3). Ein solcher Gegenstrang lässt sich entweder durch vorherige Exonukleasebehandlung eines entsprechenden Wildtyptemplates oder aus einer asymmetrischen PCR zur Verfügung stellen. Diese Gensynthesestrategie ist jedoch auf die Erzeugung bzw. Reproduktion von homologen Genen begrenzt. Mit Hilfe der T4-DNA Ligase lassen sich auch Paare von Oligonukleotiden mit Hilfe deutlich kürzerer Übergangsstücke miteinander verknüpfen (US 5 158

877; siehe auch Figur 1A, Nr. 5). Eine solche Ligation setzt auch hier eine Phosphatgruppe am 5'-Ende des stromabwärts (zum 3'-Ende hin) gelegenen Oligonukleotides voraus. Eine Variante dieses Verfahrens geht von einer deutlich höheren Anzahl einzelsträngiger Oligonukleotide aus, die schließlich in einem gemeinsamen Ligationsschritt durch die T4-DNA Ligase miteinander verknüpft werden (Chen, 1990; Figur 1A, Nr. 6). Eine solche Ligation lässt sich entweder in einem Schritt (all-in-one) oder aber auch sequentiell durchführen. Ein Nachteil bei den Einzelstrangtechniken ist das Fehlen eines Gegenstranges zur entsprechenden Klonierung in Vektoren. Chen et al. konnten jedoch zeigen, daß die direkte Klonierung von Einzelsträngen in zuvor geöffnete Vektoren durchaus möglich ist. Die Verwendung von T4-DNA Ligasen schränkt zudem die Ligationsbedingungen auf Temperaturen um 37°C ein. Dadurch können Sekundärstrukturen, die bei langen, einzelsträngigen Oligonukleotiden häufig entstehen, die Ligation nachteilig beeinflussen.

5 [0008] Andere Gensynthesestrategien kombinieren die Vorteile aus Ligase- bzw. Polymerasebasierenden Teilschritten (Au, 1998; Chalmers, 2001; siehe auch Figur 1A, Nr. 7). Die von Au et al. vorgestellte Synthesestrategie (Au, 1998) geht von zueinander komplementären Oligonukleotiden aus (um 40 Nukleotide), die zunächst mit Hilfe thermostabiler Ligasen (Pfu-DNA Ligase) in einer Ligase-Kettenreaktion (LCR) zu doppelsträngigen Teilfragmenten kombiniert werden. Diese Fragmente werden anschließend isoliert und über PCR neu miteinander kombiniert.

10 [0009] Von diesen sich in Lösung abspielenden Reaktionen weichen Techniken ab, die den Aufbau von Genen auf fester Phase (z.B. auf Beads) als Grundlage haben (US6083726, WO9517413; siehe auch Figur 1A, Nr. 4). Eine Verknüpfung mit einer solchen Phase kann entweder über die terminale Modifikation von DNA mit hochaffinen Bindungsmolekülen (Biotin, Digoxigenin) oder mit funktionalen Gruppen (NH₂, COOH, SH) erreicht werden. Diese Synthesestrategien haben den großen Vorteil, dass Fragmente, die bei einer Ligation nicht eingebaut werden, bei den anschließenden Waschschritten entfernt werden können. Der sequentielle Aufbau größerer Gene kann, basierend auf einer solchen Festphasenstrategie, entweder chemisch (z.B. über 5'Iod- bzw. 3'Thiophosphatmodifizierte Oligonukleotide) oder enzymatisch z.B. durch repetitiven Verdau mit Alw261 (US 6 083 726) erfolgen. Beim enzymatischen Aufbau wird die T4-DNA Ligase, zur blunt end bzw. sticky end Ligation der doppelsträngigen Genfragmente oder die T4-RNA-Ligase zur Ligation der einzelsträngigen Oligonukleotide verwendet (WO 9517413).

15 [0010] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es ein vorteilhaftes Verfahren zur Herstellung von DNA zur Verfügung zu stellen.

[0011] Überraschenderweise wurde gefunden, daß durch eine Exonukleasereaktion nach Ligation an scharnierartigen Übergangsstücken das gewünschte Produkt oder Zwischenprodukt besonders angereichert und/oder selektiert werden kann.

20 [0012] Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Herstellung von DNA, das eine matrizenabhängige Ligation ("template directed ligation") an Übergangsstücken und eine nachfolgende Exonukleasereaktion umfaßt.

[0013] Ein erster Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von DNA, das umfasst, daß man

25 a) n einzelsträngige Basis-DNA-Oligonukleotide bereitstellt, die unmittelbar aufeinanderfolgende Teile der Nukleotidsequenz der herzustellenden DNA sind, wobei

- i) das zweite bis n-te Basis-DNA-Oligonukleotid am 5'-Ende phosphoryliert ist und
- ii) n wenigstens 2 ist;

30 b) wenigstens (n-1) einzelsträngige Scharnier-DNA-Oligonukleotide bereitstellt, wobei für die Scharnier-DNA-Oligonukleotide gilt, daß der 3'-terminale Bereich eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids wenigstens teilweise komplementär zum 3'terminalen Bereich eines Basis-DNA-Oligonukleotids ist, und der 5'-terminale Bereich desselben Scharnier-DNA-Oligonukleotids wenigstens teilweise komplementär zum 5'-terminalen Bereich des unmittelbar darauffolgenden Basis-DNA-Oligonukleotids ist, so daß im Falle der Hybridisierung eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids mit 2 unmittelbar aufeinanderfolgenden Basis-DNA-Oligonukleotiden ein im Bereich des Scharnier-DNA-Oligonukleotids doppelsträngiges DNA-Hybrid entsteht;

35 c) die Basis-DNA-Oligonukleotide mit den Scharnier-DNA-Oligonukleotiden in Kontakt bringt;

40 d) das aus Schritt c) resultierende DNA-Hybrid einer Ligationsreaktion unterwirft;

45 e) das Reaktionsprodukt aus Schritt d) einer Exonukleasereaktion unterwirft, wobei der durch ligierte Basis-DNA-Oligonukleotide gebildete DNA-Strang des Reaktionsprodukts aus Schritt d) wenigstens zwei Cap-Strukturen umfaßt.

50 [0014] In einem ersten Schritt des Verfahrens werden n einzelsträngige Basis-DNA-Oligonukleotide bereitstellt, die unmittelbar aufeinanderfolgende Teile der Nukleotidsequenz der herzustellenden DNA sind, wobei n wenigstens 2 ist. Die Zahl n ist vorzugsweise 3 bis 100, bevorzugter 5 bis 50, am bevorzugtesten 7 bis 25.

[0015] Der Ausdruck "Oligonukleotid" in dieser Anmeldung -bedeutet keine besondere Einschränkung bezüglich der

Länge des Oligonukleotids. Die Basis-DNA-Oligonukleotide haben üblicherweise eine Länge von 45 bis 1000 Nukleotiden, bevorzugt von 50 bis 500, bevorzugter von 75 bis 300, am bevorzugtesten von 100 bis 150 Nukleotiden. Die Basis-DNA-Oligonukleotide können auf verschiedene Weisen hergestellt werden. Üblich ist es aber, zur Herstellung die Phosphoramidit-Methode zur Synthese von Oligonukleotiden einzusetzen. Einzelheiten dieser Synthesemethode

5 und zur Durchführung geeignete Vorrichtungen sind dem Fachmann bekannt und können beispielsweise Beaucage, S.L. & Iyer, R.P. (1993) Tetrahedron, 49 (28), 6123-6194; Caruthers, M.H. et al. (1987) Methods in Enzymol., 154, 287-313; Beaucage, S.L. & Caruthers, M.H. (1981) Tetrahedron Lett. 22 (20), 1859-1862 entnommen werden.

[0016] Das "erste" Basis-DNA-Oligonukleotid ist das in der herzustellenden DNA am meisten 5' gelegene Basis-DNA-Oligonukleotid, bezogen auf den Strang, dessen Sequenz der Sequenz des Basis-DNA-Oligonukleotids entspricht. Die Sequenz des "zweiten" Basis-DNA-Oligonukleotids schließt sich unmittelbar an das 3'-Ende des "ersten" Basis-DNA-Oligonukleotids an. Das "n-te" oder "letzte" Basis-DNA-Oligonukleotid ist das in der herzustellenden DNA am meisten 3' gelegene Basis-DNA-Oligonukleotid, bezogen auf den Strang, dessen Sequenz der Sequenz des Basis-DNA-Oligonukleotids entspricht.

[0017] Die Basis-DNA-Oligonukleotide mit Ausnahme des ersten Basis-DNA-Oligonukleotids sind am 5'-Ende phosphoryliert. Dies ist für die spätere Ligation erforderlich. Die Phosphorylierung kann nach der Synthese der Oligonukleotide in einer separaten Reaktion erfolgen. Bevorzugt ist es aber, die Phosphorylierung unmittelbar am Ende der Oligonukleotidsynthese im DNA-Synthesizer durchzuführen. Die Durchführung dieser Methode ist dem Fachmann bekannt.

[0018] In einem weiteren Schritt des Verfahrens werden wenigstens (n-1) einzelsträngige Scharnier-DNA-Oligonukleotide bereitgestellt. Die Scharnier-DNA-Oligonukleotide haben in der Regel eine Länge von 8 bis 300 Nukleotiden, bevorzugt von 10 bis 100, bevorzugter von 16 bis 70 Nukleotiden, am bevorzugtesten von 20 bis 40 Nukleotiden. Auch die Scharnier-DNA-Oligonukleotide werden vorzugsweise durch die Phosphoramidit-Methode hergestellt.

[0019] Scharnier-DNA-Oligonukleotide sind Oligonukleotide, die durch Hybridisierung mit 2 unmittelbar aufeinanderfolgenden Basis-DNA-Oligonukleotiden zu einem DNA-Hybrid führen können, das einen doppelsträngigen und zwei einzelsträngige Bereiche aufweist. Das Scharnier-DNA-Oligonukleotid erfüllt damit die Funktion einer Ligationsmatrize, da es zwei unmittelbar aufeinanderfolgende Basis-DNA-Oligonukleotide räumlich zueinander führt, so daß unter geeigneten Bedingungen eine Ligation erfolgen kann. Der 3'-terminale Bereich eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids ist also wenigstens teilweise komplementär zum 3'-terminalen Bereich eines bestimmten Basis-DNA-Oligonukleotids, und der 5'-terminale Bereich desselben Scharnier-DNA-Oligonukleotids wenigstens teilweise komplementär zum 5'-terminalen Bereich des unmittelbar darauffolgenden Basis-DNA-Oligonukleotids, so daß im Falle der Hybridisierung eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids mit 2 unmittelbar aufeinanderfolgenden Basis-DNA-Oligonukleotiden ein im Bereich des Scharnier-Oligonukleotids doppelsträngiges DNA-Hybrid entsteht.

[0020] Die Komplementarität muß nicht 100% sein, sie muß aber ausreichen, um eine Hybridisierung unter geeigten Bedingungen zu gewährleisten. Bevorzugt ist eine Identität von wenigstens 95 %. In einer besonderen Ausführungsform ist die Komplementarität 100 %.

[0021] Die Länge des mit einem bestimmten Basis-DNA-Oligonukleotid hybridisierenden Bereichs eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids hängt in erster Linie von der Gesamtlänge des Scharnier-DNA-Oligonukleotids ab. Üblicherweise kann die 5'-terminale Hälfte eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids mit dem einen Basis-DNA-Oligonukleotide hybridisieren, die 3'-terminale Hälfte des Scharnier-DNA-Oligonukleotids mit einem anderen. Es kann aber durchaus eine Abweichung von dieser hälf tigen Aufteilung gegeben sein.

[0022] In einer besonderen Ausführungsform sind die Scharnier-DNA-Oligonukleotide so modifiziert, daß sie am 3'-Ende nicht enzymatisch verlängert werden können, z. B. durch DNA-Polymerasen.

[0023] In einem dritten Schritt des Verfahrens werden die Basis-DNA-Oligonukleotide mit den Scharnier-DNA-Oligonukleotiden in Kontakt gebracht. Dies erfolgt unter solchen Bedingungen, daß Hybridisierungen zwischen dem oder den Scharnier-DNA-Oligonukleotid(en) und den Basis-DNA-Oligonukleotiden stattfinden können.

[0024] In einem weiteren Schritt wird das aus dem vorhergehenden Schritt resultierende DNA-Hybrid einer Ligationsreaktion unterworfen. Dieser Schritt kann auch im wesentlichen gleichzeitig mit dem dritten Schritt zusammen vorgenommen werden, d. h. die verschiedenen Oligonukleotide werden einfach zusammen mit den Ligationsreagenzien gemischt und unter solchen Bedingungen inkubiert, daß eine Ligation stattfinden kann.

[0025] Es können verschiedene Enzyme mit Ligase-Aktivität zur Ligation eingesetzt werden, beispielsweise T4-DNA-Ligase, die in einem Temperaturbereich von 16°C bis 37°C die höchste Aktivität aufweist. Es hat sich aber als besonders vorteilhaft herausgestellt, eine thermostabile Ligase zu verwenden. Dadurch können selbst bei langen Basis-DNA-Oligonukleotiden (mit einer Länge >150 Nukleotide) bei erhöhter Temperatur noch gute Ligationsausbeuten erhalten werden. Bevorzugte Enzyme sind *Taq* DNA-Ligase und *Pfu* DNA-Ligase.

[0026] Wesentlich für das erfindungsgemäße Verfahren ist, daß das Reaktionsprodukt der Ligationsreaktion in einem fünften Schritt einer Exonukleasereaktion unterworfen wird. "Exonuklease" im Sinne dieser Anmeldung ist ein Enzym, das Nukleotide sequenziell von freien Enden eines linearen Nukleinsäuresubstrats abspaltet. Im Gegensatz dazu spaltet eine "Endonuklease" das Nukleinsäuresubstrat an internen Stellen der Nukleotidsequenz.

[0027] Diese Reaktion kann sich unmittelbar an die Ligation anschließen, es ist aber auch denkbar, daß zwischen Ligation und Exonuklease-Behandlung Zwischenschritte erfolgen. Das Reaktionsprodukt der Ligation kann nach der Ligation isoliert oder angereichert werden, beispielsweise durch Fällung der DNA. Es ist aber auch denkbar, daß das Reaktionsgemisch im wesentlichen unverändert der Exonuklease-Behandlung unterworfen wird.

5 [0028] Zur Exonuklease-Behandlung werden Enzyme mit Exonuklease-Aktivität eingesetzt. Möglich sind beispielsweise Exonuklease VII, allgemein Exonukleasen, bevorzugt Exonuklease VII, jedoch auch Exonuklease I, Exonuklease III und Exonuklease V als auch DNase I sowie Mischungen der soeben beschriebenen Hydrolasen.

[0029] Der durch ligierte Basis-DNA-Oligonukleotide gebildete DNA-Strang des Reaktionsprodukts enthält wenigstens 2 Cap-Strukturen. Eine "Cap-Struktur" im Sinne dieser Anmeldung ist eine Struktur, die einem Ende einer linearen Nukleinsäure Resistenz gegen eine Exonuklease verleiht. Dadurch ist die zu synthetisierende gewünschte DNA-Sequenz vor Nukleaseabbau geschützt. Eine erste Cap-Struktur liegt im 5'-terminalen Bereich der zu synthetisierenden DNA-Sequenz, eine weitere Cap-Struktur liegt im 3'-terminalen Bereich der zu synthetisierenden DNA-Sequenz.

10 [0030] Die Cap-Struktur kann, muß aber nicht am unmittelbaren 5'-bzw. 3'-Ende des durch ligierte Basis-DNA-Oligonukleotide gebildeten DNA-Strangs des Reaktionsprodukts liegen. Die Erfindung umfaßt auch den Fall, daß ein oder zwei Enden dieses Stranges Nukleotide aufweisen, die nicht gegen Exonuklease-Abbau geschützt sind. Wesentlich ist, daß die gewünschte DNA-Sequenz durch Cap-Strukturen geschützt ist. Es ist also auch der Fall umfaßt, daß durch Basis-DNA-Oligonukleotide an den Enden des entstehenden DNA-Strangs Nukleotide eingeführt werden, die nicht in der gewünschten DNA-Sequenz enthalten sein müssen. Derartige Nukleotide müssen nicht gegen Nukleaseabbau geschützt sein.

15 [0031] Dem Fachmann sind verschiedene Cap-Strukturen bekannt. Beispiele dafür sind Thioatbindungen zwischen einzelnen Nukleotiden, 2'OMethyl-RNA, modifizierte Basen, DNA-Sequenzen mit Schleifenstruktur(en) und/oder RNA-Sequenzen mit Schleifenstruktur(en). Basenmodifikationen, die Schutz gegen Exonuklease-Abbau verleihen, sind C-5 Propinyl bzw. C-5 Methyl modifizierte Basen, 2-Amino-2'-deoxy Adenin, N-4-Ethyl-2'-deoxy Cytidin, 2'-deoxy Inosin, 2'-deoxy Uridin sowie die unnatürlichen Basen Nebularin, Nitropyrrol und 5-Nitroindole.

20 [0032] Es gibt auch weitere 3' und 5' Modifikationen, die vor Nukleaseabbau schützen, wie primäre, sekundäre oder tertiäre Amine, die ebenso wie Hydroxyl- und Thiol-Gruppen über aliphatische oder durch Sauerstoff "O", Schwefel "S" bzw. Stickstoff "RR'R"N" modifiziert aliphatische Linker an terminalen Phosphatgruppen (3' bzw. 5' Phosphat) hängen, verzweigte und unverzweigte Ethylenglykole, genauso wie Glycerin Derivate. Eingesetzt werden können auch endständige Markierungen wie Biotin, Dinitrophenol, und Digoxigenin sowie alle handelsüblichen Farbstoffe, die unmittelbar als Phosphoramidite bzw. mittelbar als Aktivester erhältlich sind.

25 [0033] In der Regel wird eine erste Cap-Struktur durch das erste Basis-DNA-Oligonukleotid eingeführt, eine weitere Cap-Struktur durch das n-te Basis-DNA-Oligonukleotid. Theoretisch wäre es auch denkbar, daß weiter innen liegende Basis-DNA-Oligonukleotide eine Cap-Struktur umfassen, dies ist aber nicht bevorzugt.

[0034] Das Reaktionsprodukt der Exonukleasebehandlung ist einzelsträngige DNA mit Cap-Strukturen an ihren Enden. Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung kann diese einzelsträngige DNA durch PCR in doppelsträngige DNA überführt und vermehrt werden. Dazu werden vorzugsweise Primer verwendet, deren Zielsequenzen im 5'-terminalen Bereich bzw. im 3'-terminalen Bereich der gewünschten DNA-Sequenz liegen. Die Zielsequenzen liegen üblicherweise im Bereich des ersten bzw. letzten Basis-DNA-Oligonukleotids. Durch die Primer können auch Restriktionsschnittstellen an den Endbereichen der doppelsträngigen DNA eingeführt werden, die Primer enthalten dann eine Erkennungssequenz für eine oder mehrere Restriktionsendonukleasen. Das so hergestellte doppelsträngige DNA-Produkt kann durch Restriktionsenzyme entsprechend verdaut werden und beispielsweise in ein Plasmid oder einen Vektor kloniert werden. Die DNA kann dann in eine Zelle eingeführt werden. Dadurch kann die so hergestellte DNA beispielsweise in Bakterien vermehrt werden. Derartige Techniken sind dem Fachmann bekannt. Die DNA kann auch in eukaryontische Zellen, z. B. Säugerzellen eingeführt werden, um gewünschte Polypeptide zu exprimieren.

30 [0035] In einer besonderen Ausführungsform enthalten ein oder mehrere Basis-DNA-Oligonukleotide und/oder Scharnier-DNA-Oligonukleotide randomisierte Nukleotide. Dadurch kann DNA hergestellt werden, die an bestimmten Stellen Variationen aufweist. Der Einbau solcher Variationen in eine Sequenz erfolgt bereits während der Oligonukleotidsynthese. Durch Verwendung von DNA-Phosphoramiditmischungen, die anstatt der einzelnen Phosphoramidite sämtliche Basen (dA, dC, dG und dT) in einem bestimmten Verhältnis enthalten (N-Mischungen), gelangt man zu partiell oder vollständig randomisierten Oligonukleotiden. Diese Oligonukleotide können über das hier beschriebene Verfahren zu kompletten Genen vervollständigt werden und liefern, eingebaut in die entsprechenden Vektoren, die gewünschten Protein- oder Peptidbibliotheken. Solche Bibliotheken sind die Grundlage für die Suche nach bestimmten, neuen Eigenschaftsmustern. Bei Zumischung einer N-Mischung zu den einzelnen Monomeren (XN-Mischungen) besteht darüber hinaus die Möglichkeit, den Grad der Randomisierung einzuschränken. Hierdurch wird gewährleistet, daß die Variationsbreite innerhalb einer Protein- bzw. Peptidbibliothek im Verhältnis zum Ausgangsgen klein bleibt. Diese Strategie verhindert, daß entstandene positive Mutationen durch Überlagerung mit weiteren Mutationen in der Protein- oder Peptidbibliothek unterdrückt werden oder verlorengehen.

35 [0036] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist DNA, die durch das beschriebene Verfahren erhältlich ist, insbesondere

solche, die durch das Verfahren hergestellt wurde. Die Erfindung betrifft außerdem ein DNA-Hybrid, das einen DNA-Einzelstrang, einen oder mehrere damit hybridisierende Scharnier-DNA-Oligonukleotide sowie wenigstens zwei Cap-Strukturen umfaßt.

[0037] Die Erfindung betrifft auch ein Kit, das geeignet ist zur Durchführung des Verfahrens. Das erfindungsgemäße Kit enthält ein erstes Basis-DNA-Oligonukleotid, das eine Cap-Struktur umfaßt, ein weiteres Basis-DNA-Oligonukleotid, das eine Cap-Struktur umfaßt, ein Enzym mit Ligaseaktivität und ein Enzym mit Exonukleaseaktivität. Das Kit kann außerdem Reagenzien enthalten, die zur Durchführung eingesetzt werden können, z. B. konzentrierte Pufferlösungen.

[0038] Das Kit kann darüberhinaus Mittel zur Durchführung einer PCR enthalten. Derartige Mittel können Primer und eine thermostabile DNA-Polymerase sein. Die Primer enthalten vorzugsweise eine oder mehrere Erkennungssequenzen für eine oder mehrere Restriktionsendonukleasen.

[0039] Das vorliegende Verfahren zur chemoenzymatischen Totalsynthese von Genen (vgl. Figur 2) zeichnet sich durch zahlreiche Vorteile gegenüber herkömmlichen Verfahren aus:

[0040] Es erlaubt die totalsynthetische Konstruktion von Genen auf Basis besonders langer Basis-DNA-Oligonukleotide (45-1000 Basen). Eine Gegenstrangsynthese entfällt, was den Zeitaufwand und die Kosten zum Aufbau von Genen oder Genklustern deutlich reduziert. Im Vergleich zu anderen Gensynthesestrategien kommt man ohne die zeitaufwendige Zwischenklonierung von Genfragmenten aus. Zudem erlaubt der Aufbau lediglich eines Stranges die Einführung von Mutationen auf DNA-synthetischer Ebene. Mutagenisierte oder randomisierte Abschnitte können so an beliebiger Stelle des Gens generiert und bei der Gegenstrangsynthese (PCR) vervollständigt werden. Schwierigkeiten bei der Hybridisierung randomisierter Sequenzen entfallen hierdurch.

[0041] Eine Besonderheit des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Verwendung von Cap-Strukturen, insbesondere von 5' und 3' Überhängen, zur *in vitro* Selektion von Ligationsprodukten. Solche Cap-Strukturen bestehen aus 3' bzw. 5' Nukleaseresistenzen, die durch Polymerasen oder Enzyme mit Nukleaseaktivität (5' → 3' sowie 3' → 5') nicht verkürzt werden können. Das nach der Ligation aufgebaute Vollängenprodukt ist an beiden Enden vor Nukleaseabbau geschützt, alle kürzeren Zwischenprodukte oder eingesetzte Oligonukleotide, einschließlich der endständigen Oligonukleotide jedoch nicht. Dadurch wird das nach Nukleasebehandlung an beiden Enden geschützte Vollängenprodukt im Reaktionsansatz selektiert bzw. stark angereichert. Die sich üblicherweise anschließende PCR liefert das gewünschte doppelsträngige Genprodukt.

[0042] Die Synthese- und Aufreinigungsprotokolle können so modifiziert werden, dass besonders lange Oligonukleotide in hoher Qualität und Exaktheit erhalten werden können. Zudem erlaubt der Einsatz eines speziellen Phosphorylierungsreagenzes die Abtrennung ausschließlich terminal modifizierter Basis-DNA-Oligonukleotide, was die oligonukleotidspezifische Ligation (OSL) sehr effizient gestaltet.

[0043] Bereits beim Aufbau der Oligonukleotide können Faktoren, wie beispielsweise die Codon Usage auf den jeweiligen Wirt optimal angepasst werden, was die Expression heterologer Proteine teilweise erst ermöglicht.

[0044] Der Zusammenbau des Zielgens oder -clusters erfolgt enzymatisch mit Hilfe von kurzen komplementären Oligonukleotiden (Scharniere), die als Ligationsmatrizen fungieren. Dadurch entfällt die Notwendigkeit eines kompletten Gegenstranges zur spezifischen Ligation der Basis-DNA-Oligonukleotide. Eine unerwünschte Einflussnahme dieser Scharniere in der nachfolgenden PCR kann durch die Verwendung von 3'Phosphatgruppen, die sich enzymatisch nicht verlängern lassen, unterbunden werden.

[0045] Für die OSL können neben den üblichen Ligasen wie z.B. die T4 DNA Ligase (16°C bis 37°C) auch thermostabile Ligasen wie z.B. *Taq* oder *Pfu* DNA Ligase (37°C-80°C) eingesetzt werden. Dadurch gelingt es häufig optimale Ligationsbedingungen ausfindig zu machen.

[0046] Die Totalsynthese von Zielgenen mit Hilfe des hier vorgestellten Verfahrens ermöglicht neue Möglichkeiten beim Aufbau von Genbibliotheken:

- 45 i) Beispielsweise können bestimmte Aminosäuren oder Sequenzabschnitte auf DNA-synthetischer Ebene vollständig randomisiert und somit in das Gen eingebracht werden.
- ii) Andernfalls gelingt es mit Hilfe dieser Technologie auch "eingeschränkt-randomisierte" Sequenzen zu generieren, die beispielsweise lediglich hydrophobe Aminosäuren zulassen, im Gen zulassen (z.B. NTN).

[0047] Figur 1A und 1B zeigen schematisch die Prinzipien verschiedener Verfahren zur Herstellung von DNA (siehe auch oben).

[0048] Figur 2 zeigt schematisch eine bestimmte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. Es werden fünf Basis-DNA-Oligonukleotide bereitgestellt, von denen das erste und fünfte jeweils eine Cap-Struktur enthalten. Die Basis-DNA-Oligonukleotide zwei bis fünf sind 5'-terminal phosphoryliert. Als Ligationsmatrizen fungieren vier Scharnier-DNA-Oligonukleotide, die unterhalb der Übergangsstellen der Basis-DNA-Oligonukleotide gezeigt sind. Durch die Ligation werden die Basis-DNA-Oligonukleotide zu einem Einzelstrang verbunden, an den noch die Scharnier-DNA-Oligonukleotide hybridisiert sind. Diese werden aber durch die Exonuklease abgebaut, während der ligierte Einzelstrang durch die Cap-Strukturen geschützt ist. Der Einzelstrang wird durch PCR in doppelsträngige DNA überführt. Mit der

PCR wurden Schnittstellen eingeführt, so daß ein Restriktionsverdau erfolgen kann.

[0049] Figur 3 zeigt das in Beispiel 1 hergestellte Xylanasegen nach Ligation durch Taq-Ligase, Exonuklease-Behandlung und PCR-Amplifikation. Links ist ein 100bp Marker (New England Biolabs) aufgetragen, rechts 10µl des Amplifikationsansatzes auf einem 2%igen Agarosegel in 1xTBE.

5 [0050] Figuren 4A und 4B zeigen die durch DNA-Sequenzierung ermittelte Nukleotidsequenz der in Beispiel 1 hergestellten DNA nach Klonierung in den Vektor pET23a. Die ermittelte Sequenz des Xylanasegens stimmt mit der gewünschten Sequenz überein.

[0051] Figur 5 zeigt die in Beispiel 2 hergestellte Chymotrypsinogen A-DNA nach Ligation durch Taq-Ligase, Exo-

10 nuklease-Behandlung und PCR-Amplifikation. Links ist ein 100bp Marker (New England Biolabs) aufgetragen, rechts 10µl des Amplifikationsansatzes auf einem 1.5%igen Agarosegel in 1xTBE.

[0052] Figuren 6A und 6B zeigen die durch DNA-Sequenzierung ermittelte Nukleotidsequenz der in Beispiel 2 hergestellten DNA nach Klonierung in den Vektor pET23a. Die ermittelte Sequenz des Gens für Chymotrypsinogen A stimmt mit der gewünschten Sequenz überein.

[0053] Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

15

Beispiel 1: Synthese des Xylanase Gens aus *A. kawachii*

Herstellung

20 1. ODN-Synthese

[0054] Die Synthese sämtlicher Oligonukleotide (ODN) erfolgte nach der Phosphoramidit-Methode an einem Expedite 8909 Synthesizer (ehem. Perseptive Biosystems). Alle verwendeten Chemikalien wurden über die Firma Prolico (Harnburg) bezogen. Die verwendeten Amidite wurden in trockenem Acetonitril (Prolico) aufgenommen (alle Bausteine, einschließlich des Phosphorylierungsreagenzes, in einer Endkonzentration von 0.1 M) und vor Ihrem Einsatz über aktiviertem Molekülsieb (Merck) getrocknet. Um eine möglichst effiziente Synthese von besonders langen Oligonukleotiden zu ermöglichen, wurden alle Kupplungszeiten auf 3 Minuten verlängert. Als Aktivator für die Kupplungsreaktion diente Dicyanoimidazol (Prolico). Das verwendete CPG-Trägermaterial wies dabei eine Porenweite von 1000Å (Länge <130bp, Prolico) bzw. O 2000Å (Länge > 130bp, Glen Research) auf. Um möglichst vollständig 5'-phosphorylierte ODN's zu erhalten, wurde nach der DMTr-on Synthese das 5' Ende mit Hilfe von [3-(4,4'-Dimethoxytrityloxy)-2,2'-dicarboxyethyl]propyl-(-2-cyanoethyl)-(N,N'-diisopropyl)-phosphoramidit (CPRII, Glen Research) umgesetzt. Um auch in diesem Fall eine entsprechend hohe Kupplungsausbeute zu erhalten, wurden die Kupplungszeiten für diese Verbindung auf 30 Minuten verlängert. Insgesamt wurden so für die Xylanase 7 ODN's (Xyl1-Xyl7), darunter 6 5'-terminal phosphorylierte (Xyl2-Xyl7), mit einer durchschnittlichen Länge von 70-90b aufgebaut (Tabelle 1). Für die Synthese der Scharnier-DNA-Oligonukleotide (Übergangsstücke ÜXyl1-6) wurden die Syntheseprotokolle nicht weiter modifiziert.

2. Aufreinigung

40 [0055] Nach der Synthese erfolgte die Entschützung der Basenschutzgruppen. Hierzu wurde das Trägermaterial (etwa 7mg CPG) in ein verschraubbares Gefäß überführt und 24h bei 37°C mit einer Lösung (500µl) bestehend aus drei Teilen 32%igem Ammoniak (Merck) und einem Teil abs. Ethanol (Fluka) behandelt. Nach erfolgter Abspaltungsreaktion läßt man den Ansatz auf Eis abkühlen und versetzt die Mischung mit 100µl einer 1M Triethylammoniumacetat-Lösung (TEAA). Die gesamte Probe wird anschließend durch Filtration vom Trägermaterial befreit und über RP-HPLC aufgereinigt (Säule: 4.6mm x 300mm gepackt mit POROS R2 (Perseptive Biosystems); Puffer A: 100mM TEAA, 5% Acetonitril; Puffer B: Acetonitril; Fluß: 4ml/min; Gradient: 40 Säulenvolumina von 0% bis 50% Puffer B). Die Hauptfraktionen wurden aufgefangen und unter Vakuum getrocknet. Nach Detritylierung mit 80% Essigsäure (30 Minuten bei 22°C) wurde die Essigsäure unter Vakuum abgezogen und der verbliebene Rückstand zur Abspaltung der Phosphatschutzgruppe 15 Minuten mit 300µl wässriger Ammoniaklösung (2 Teile dest. Wasser/konz. Ammoniak) behandelt. Da das erste Basis-DNA-Oligonukleotid Xyl1 keine terminale Modifikation (5' Phosphat) aufweist, entfiel die basische Behandlung. Anschließend wurden die fertig entschützten Oligonukleotide mit Ethanol gefällt, in dest. Wasser aufgenommen und über denaturierende PAGE (15%) analysiert. Die Sichtbarmachung der Oligonukleotide erfolgte durch Silberfärbung. Verkürzte Sequenzen konnten hierbei für alle Oligonukleotide nicht nachgewiesen werden.

55 **3. Gensynthese (Überblick)**

[0056] Die Gensynthese läßt sich in zwei Teilschritte unterteilen. Zunächst findet ein Ligationsschritt statt, bei dem die Basis-DNA-Oligonukleotide (Xyl1-Xyl7, Tabelle 1) nach Hybridisierung an die kurzen Scharnier-DNA-Oligonukleoti-

de (Übergangsstücke ÜXyl1-ÜXyl6) mit Hilfe einer Ligase (z.B. *Taq*-Ligase, T4-DNA-Ligase oder *E. coli* Ligase) miteinander verknüpft werden. Dieser Teilschritt wird hier allgemein als oligonukleotidspezifische Ligation (OSL) bezeichnet. Nach der OSL wird der gesamte Reaktionsansatz mit Exonuklease VII behandelt. Hierbei werden sämtliche nicht-eingebauten Oligonukleotide, einschließlich der Scharnier-DNA-Oligonukleotide hydrolysiert. Ein kleiner Teil des Hydrolyseansatzes wird anschließend in einer PCR mit zwei terminal zu den ODN's Xyl1 und Xyl7 bindenden Primern (APXyl1 und APXyl7), eingesetzt. Diese Reaktion liefert spezifisch das Xylanase Gen und ermöglicht gleichzeitig durch die mit APXyl1 sowie APXyl7 eingeführten Linkersequenzen eine Klonierung in ein entsprechendes Plasmid.

4. Oligonukleotidspezifische Ligation (OSL)

[0057] Für die TSL wurden je 2 μ l der ODN's Xyl1-Xyl7 (10 μ M) sowie 10 μ l der Scharnier-DNA-Oligonukleotide ÜXyl1-ÜXyl6 (10 μ M) in einem Reaktionsgefäß zusammengegeben. Anschließend wurde dieser Ansatz mit 8.2 μ l 10xLigase Puffer (New England Biolabs) vermischt und mit 2 μ l (80U) Taq-DNA Ligase (New England Biolabs) versetzt. Die weitere Inkubation erfolgte bei 37°C für 12-14h.

Tabelle 1. Oligonukleotide zum Aufbau des Xylanasegens.

Name	Sequenz (von 5' in 3')	Modifikation
XyI1	t*a*g*g*c*aaatgggaattccatgtgactgtttttaactacgtgc aaaactacaacggcaaccttgtctgtatcacctatgacgagagtgc cgga	Keine
XyI2	acatttccatgtactgggaagatggaggtagctccgacttgtctgg ctggaccactgttcttcgaatgtcatcgactcttg	5' Phosphat
XyI3	ccgaatacagtgttttgcgttcccttccatctcgctgtgtacgg ctgggttaactatccctcaggctgaatactacatcgtc	5' Phosphat
XyI4	gaggatcacggtagttacaacccttgcagctggccacaaggctt ggaccgttaccgttactctgtatggaaagcaccttaccaagtc gcac	5' Phosphat
XyI5	cgacactcgaactaacgaaccatcgatcacggaaacaagcac gttccacgcgttacttccctgtcgagagagcacgcgcacatctg	5' Phosphat
XyI6	gaacggtagtgcgttccaccatcaactctggcccccagatgg tctggaaatccgacttcaaita	5' Phosphat
XyI7	tcaaggatggcgttggaaagcatggagcgccgcggc aggccgtgtcacgttccctttaactcgagcgaaat*t*a*a*t*t	5' Phosphat
ÜXyI1	gtacatggaaaatgttccggactctcgic	Keine
ÜXyI2	aaggactgtatcgccagatgtatcgatag	Keine
ÜXyI3	atcaccgtaatctcgacgtatgtatatic	Keine
ÜXyI4	ttatgtcgatgtcggtgcagacttgtttag	Keine
ÜXyI5	caacagtccaccgttccagatgtgcgtqc	Keine
ÜXyI6	actgccccatgaccgtataatgtaaatgtcgata	Keine
APXyI1	aattggaaattccatata	Keine
APXyI7	aattaattccgtcgagt	Keine

* Phosphorthioatbindungen

5. Exonukleasebehandlung

[0058] Der gesamte Ligationsansatz wurde zunächst mit 50 μ l 3M Natriumacetat (pH 5.2) und 500 μ l abs. Ethanol auf Eis gefällt. Der Rückstand wird nach der Fällung unter Vakuum getrocknet und in 50 μ l dest. Wasser gelöst. Zu diesem Ansatz wurden 50 μ l Exonuklease VII (20U, Pharmacia Biotech) in 100mM Tris-HCl pH8.0, 400mM NaCl zugegeben und das Ganze 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Nukleaseansatz wurde anschließend 1 x mit Phenol-Chloroform bzw. 2 x mit Chloroform ausgeschüttelt und der wässrige Überstand in ein steriles Cap überführt.

6. PCR

[0059] Zur gezielten Amplifikation des so aufgebauten, einzelsträngigen Gens wurde $2\mu\text{l}$ des Nukleaseansatzes mit je $10\mu\text{l}$ der Außenprimer APXyl1 ($10\mu\text{M}$) und APXyl7 ($10\mu\text{M}$), $8\mu\text{l}$ dNTP-Mix ($1,25\text{mM/dNTP}$), $5\mu\text{l}$ $10\times$ Polymerase Puffer (New England Biolabs) und $13\mu\text{l}$ dest. Wasser versetzt, vermischt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Danach wurde die Mischung auf Eis abgeschreckt, mit $2\mu\text{l}$ (4U) Vent Polymerase (New England Biolabs) versetzt und bei 40°C

(Anlagerung) in den Thermocycler (Hybaid) gestellt. Die anschließende Amplifikation des Xylanasegens erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Tabelle 2:

PCR-Bedingungen		
Schritt	Temperatur	Zeit
Anlagerung	40°C	30sec
Verlängerung	72°C	1min
Denaturierung	95°C	30sec
Zyklenzahl 35		

[0060] Nach Ablauf der PCR wurde der gesamte Reaktionsansatz mit 5x Probenpuffer versetzt und über Gelelektrophorese (3% Agarose) aufgereinigt (Figur 3). Die Isolierung des Xylanase Gens erfolgte nach Elektroelution der aus dem Gel ausgeschnittenen Agarosebande (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual).

7. Klonierung

[0061] Das nach Elution und Extraktion (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual) in TE Puffer (10mM Tris-HCl, 0,5mM EDTA pH8,0) aufgenommene Xylanase Gen wurde vollständig mit den Restriktionsenzymen NdeI (New England Biolabs) und XbaI (New England Biolabs) über Nacht bei 37°C verdaut und über Gelelektrophorese erneut isoliert. Nach Elektroelution und Aufarbeitung des Fragmentes wurde dieses über Nacht bei 16°C in den entsprechend geöffneten pET23a Vektor (Novagen) eingesetzt. Zur Ligation wurden 200U T4 DNA Ligase eingesetzt. 5µl des Ligationsansatzes wurden anschließend in kompetente Zellen (DH5α) transformiert (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual).

8. Sequenzierung

[0062] Die durchgeführte Sequenzierung nach Saenger bei einem willkürlich isolierten Klon, erbrachte die vollständige Übereinstimmung mit der entworfenen Sequenz (Figur 4A und 4B).

Beispiel 2: Synthese des Gens für humanes Chymotrypsinogen A

1. ODN Synthese

[0063] Die Synthese sämtlicher Oligonukleotide (ODN) erfolgte nach der Phosphoramidit-Methode an einem Expedite 8909. Alle verwendeten Chemikalien und Syntheseprotokolle entsprechen den Angaben aus Abschnitt 1 von Beispiel 1. Zum Aufbau der Chymotrypsinogen-DNA wurden insgesamt 11 ODN's (Ch1-Ch11), darunter 10 5'-terminal phosphorylierte (Ch2-Ch11), mit einer durchschnittlichen Länge von 90b aufgebaut (Tabelle 3). Auch in diesem Beispiel wurden die Syntheseprotokolle zur Synthese der kurzen Übergangsstücke (ÜCh1-10) nicht weiter modifiziert.

2. Aufreinigung

[0064] Nach der Synthese erfolgte die Entschützung der Basenschutzgruppen. Hierzu wurde das Trägermaterial (etwa 7mg CPG) in ein verschraubbares Gefäß überführt und 24h bei 37°C mit einer Lösung (500µl) bestehend aus drei Teilen 32%igem Ammoniak (Merck) und einem Teil abs. Ethanol (Fluka) behandelt. Nach erfolgter Abspaltungsreaktion lässt man den Ansatz auf Eis abkühlen und versetzt die Mischung mit 100µl einer 1M Triethylammoniumacetatlösung (TEAA). Die gesamte Probe wird anschließend durch Filtration vom Trägermaterial befreit und über RP-HPLC aufgereinigt (Säule: 4,6mm x 300mm gepackt mit POROS R2 (Perseptive Biosystems); Puffer A: 100mM TEAA, 5% Acetonitril; Puffer B: Acetonitril; Fluß: 4ml/min; Gradient: 40 Säulenvolumina von 0% bis 50% Puffer B). Die Hauptfraktionen wurden aufgefangen und unter Vakuum getrocknet. Nach Detritylierung mit 80%iger Essigsäure (30 Minuten bei 22°C) wurde erneut bis zur Trockene einrotiert und zur Abspaltung der Phosphatschutzgruppe der Rückstand 15 Minuten mit 300µl wässriger Ammoniaklösung (2 Teile dest. Wasser/konz. Ammoniak) behandelt. Anschließend wurde das fertig entschützte Oligonukleotid mit Ethanol gefällt, in dest. Wasser aufgenommen und über denaturierende PAGE analysiert.

3. Gensynthese

[0065] Die hier durchgeführte Totalsynthese des Gens für Chymotrypsinogen A lässt sich genau wie beim Xylanase-Gen in zwei Teilschritte unterteilen. Zunächst werden durch OSL die langen Basis-DNA-Oligonukleotide (Ch1-11, Tabelle 3) miteinander verknüpft. Nach der OSL wird der gesamte Reaktionsansatz mit Exonuklease VII behandelt. Hierbei werden sämtliche nicht-eingebauten Oligonukleotide, einschließlich der Scharnier-DNA-Oligonukleotide hydrolysiert. Ein kleiner Teil des Hydrolyseansatzes wird anschließend in einer PCR mit zwei terminal zu den ODN's Ch1 und Ch11 bindenden Primern (APCh1 und APCh11) eingesetzt. Diese Reaktion liefert auch hier spezifisch das Chymotrypsinogen A-Gen.

Tabelle 3 Oligonukleotide zum Aufbau des Gens für Chymotrypsinogen A.

4. Oligonukleotidspezifische Ligation (OSL)

[0066] Für die TSL wurden je 0.8 μ l der ODN's Ch1-Ch11 (10 μ M) sowie 4 μ l der Scharnier-DNA-Oligonukleotide ÜCh1-ÜCh10 (10 μ M) in einem Reaktionsgefäß zusammengegeben. Alternativ kann auch ein Mischungsverhältnis von 1:1 bis 1:10 verwendet werden. Anschließend wurde dieser Ansatz mit 8.2 μ l 10xLigase-Puffer (New England Biolabs) vermischt und mit 2 μ l (8U) Taq-DNA Ligase (New England Biolabs) versetzt und auf 80 μ l mit dest. Wasser aufgefüllt. Die weitere Inkubation erfolgte bei 37°C für 12-14h.

5. Exonukleasebehandlung

[0067] Entsprechend Beispiel 1 wurde der gesamte Ligationsansatz zunächst mit 50 μ l 3M Natriumacetat (pH 5.2) und 500 μ l abs. Ethanol auf Eis gefällt. Der Rückstand wird nach der Fällung unter Vakuum getrocknet und in 50 μ l dest.

Wasser gelöst. Zu diesem Ansatz wurden 50 μ l Exonuklease VII (20U) in 100mM Tris-HCl pH8.0, 400mM NaCl zugegeben und das Ganze 45Minuten bei 37°C inkubiert. Der Nukleaseansatz wurde anschließend mit Phenol-Chloroform bzw. Chloroform ausgeschüttelt und der wässrige Überstand in ein steriles Cap überführt.

5 6. PCR

[0068] Zur Amplifikation des über OSL zusammengebauten Gens wurde 2 μ l des Nukleaseansatzes mit je 10 μ l der Außenprimer APCh1 (10 μ M) und APCh11 (10 μ M), 8 μ l dNTP-Mix (1.25mM/dNTP), 5 μ l 10xPolymerase-Puffer (New England Biolabs) und 13 μ l dest. Wasser versetzt, vermischt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Danach wurde die Mischung auf Eis abgeschreckt, mit 2 μ l (4U) Vent Polymerase (New England Biolabs) versetzt und bei 54°C (Anlagerung) in den Cycler (Hybaid) gestellt. Die Amplifikation des Chymotrypsinogen-Gens erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Tabelle 4:

PCR-Bedingungen		
Schritt	Temperatur	Zeit
Anlagerung	54°C	30sec
Verlängerung	72°C	1.5min
Denaturierung	94°C	30sec
Zyklenzahl 35		

15

20

[0069] Nach Ablauf der PCR wurde der gesamte Reaktionsansatz mit 5xProbenpuffer versetzt und über Gelelektrophorese (1.5% Agarose) aufgereinigt (Figur 5). Die Isolierung der Chymotrypsinogen-DNA erfolgte nach Elektroelution der aus dem Gel ausgeschnittenen Agarosebande (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual).

7. Klonierung

[0070] Die nach Elution und Extraktion (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual) in TE Puffer (10mM Tris-HCl, 0,5mM EDTA pH8.0) aufgenommene Chymotrypsinogen-DNA wurde vollständig mit den Restriktionsenzymen NdeI (New England Biolabs) und Xhol (New England Biolabs) über Nacht bei 37°C verdaut und über Gelelektrophorese erneut isoliert. Nach Elektroelution und Aufarbeitung des Fragmentes konnte dieses über Nacht bei 16°C in den entsprechend geöffneten pET23a Vektor (Novagen) eingesetzt werden. Zur Ligation wurden 200U T4 DNA Ligase (New England Biolabs) eingesetzt. 10 μ l des Ligationsansatzes wurden anschließend in kompetente Zellen (DH5 α) transformiert (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual).

8. Sequenzierung

[0071] Die durchgeführte Sequenzierung nach Saenger bei einem willkürlich isolierten Klon erbrachte die vollständige Übereinstimmung mit der entworfenen Sequenz (Figur 6A und 6B).

Zitierte Veröffentlichungen

45 [0072]

- Au, L.C. et al. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun., 248,200-203
- Ausubel, F.M. et al. (1994) Current protocols in molecular biology, Vol.I, Wiley
- Casimiro, D.R. et al. (1997) Structure, 5,1407-1412
- 50 Chalmers, F.M. & Curnow, K.M. BioTechniques, 30,249-252
- Chang, H.H. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun., 190,242-249
- Chen, H.B. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 871-878
- Ciccarelli, R.B. et al. (1991) Nucl. Acids Res., 19,6007-6013
- Climie, S. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87,633-637
- Dillon, P.J. & Rosen, C.A. (1990) BioTechniques, 9,298-300
- 55 Ferretti, L. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 83,599-603
- Hostomsky, Z. et al. (1987) Nucl. Acids Res., 15,4849-4856
- Jayaraman, K. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 88,4084-4088

Jayaraman, K. & Puccini, C.J. (1992) BioTechniques, 12, 392-398
Oprian, D.D. et al. (1991)
Biochemistry, 30, 11367 -11372
5 Spoat, B.S. et al. (1985) Nucl. Acids Res., 13,2959-2977
Traub, P.C. et al. (2001) Appl. Microbiol. Biotechnol. (2001),55,198-204
Uhlmann, E. & Hein, F. (1987) NucleicAcids Symp Ser, 18,237-240
Wosnick, M.A. (1989) Gene, 76,153-160
Ye, Q.Z. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun., 186,143-149

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> BioSpring Gesellschaft für Biotechnologie mbH
10 <120> Verfahren zur Herstellung von DNA
15 <130>
16 <140>
17 <141>
18 <150>
19 <151>
20 <160> 42
21 <170> PatentIn Ver. 2.1
22 <210> 1
23 <211> 96
24 <212> DNA
25 <213> künstliche Sequenz
26 <220>
27 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
28 <400> 1
29 taggcaaatt ggaaattcca tatgagtgt ggttataact acgtgcaaaa ctacaacggc 60
30 aaccttgctg attcaccta tgacgagagt gccgga 96
31 <210> 2
32 <211> 94
33 <212> DNA
34 <213> künstliche Sequenz
35 <220>
36 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
37 <400> 2
38 acatttcca tgtactggga agatggagtg agctccgact ttgtcggtgg tctgggctgg 60
39 accacgggtt cttcgaatgc tatcagctac tctg 94
40 <210> 3
41 <211> 83
42 <212> DNA
43 <213> künstliche Sequenz
44

<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA		
5 <400> 3		
ccgaatacag tgcttctggc tcctttcct acctcgctgt gtacggctgg gtaactatc	60	
10 ctcaggctga atactacatc gtc	83	
<210> 4		
<211> 86		
<212> DNA		
15 <213> künstliche Sequenz		
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA		
20 <400> 4		
gaggattacg gtgattacaa ccctgcagc tcggccacaa gccttggtagt cgtgtactct	60	
gatggaagca cctaccaagt ctgcac	86	
25 <210> 5		
<211> 86		
<212> DNA		
30 <213> künstliche Sequenz		
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA		
35 <400> 5		
cgacactcga actaacgaac catcgatcac ggaaacaagg acgttacgc agtacttctc	60	
cgttcgagag agcacgcgca catctg	86	
40 <210> 6		
<211> 70		
<212> DNA		
45 <213> künstliche Sequenz		
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA		
50 <400> 6		
gaacggtgac tttgccaaact cattcaact tctggccca gcatgggttc ggaaattccg	60	
acttcaatta	70	

5 <210> 7
<211> 81
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

10 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

15 <400> 7

tcaggtcatg gcagtggaaag catggagcgg cgccggcagc gccagggtca cgatctcc 60

taaactcgag cggaattaaat t 81

20 <210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

25 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

30 <400> 8

gtacatggaa aatgttccgg cactctcg 30

35 <210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

40 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

45 <400> 9

aagcactgta ttccggcagag tagctgatag 30

50 <210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

55 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

60 <400> 10

atcacccgtaa tcctcgacga tgttagtattc 30

65 <210> 11

5 <211> 30
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

10 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

15 <400> 11

20 ttagttcgag tgtcggtgca gacttggtag

25 <210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

30 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

35 <400> 12

40 caacagtac cgttccagat gtgcgcgtgc

45 <210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

50 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

55 <400> 13

55 aclgccatga cctgataatt gaagtgccta

60 <210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

65 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

70 <400> 14

75 aattggaaat tccatatg

80 <210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

5 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

10 <400> 15

aattaattcc gctcgagt 18

15 <210> 16
<211> 78
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

20 <220> ——————
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

25 <400> 16

atggcttc tctggctcct ctccgtgg gcctccctgg gtaccaccctt cggctgcggg 60

30 <210> 17
<211> 75
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

35 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

40 <400> 17

tggtcagcgc gcctgtcccg catcgtaat ggggaggacg ccgtccccgg ctccctggccc 60

45 <210> 18
<211> 78
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

50 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

55 <400> 18

caggacaaaa ccggcttcca ctctgcggg ggctccctca tcagcgagga ctgggtggtc 60

60 <210> 19

accgctgccc actgcggg 78

5 <211> 72
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

10 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

15 <400> 19

gtccgcacct ccgacgtgg ctagctgg gagtttgc aaggctctga cgaggagaac 60

atccaggtcc tg 72

20 <210> 20
<211> 75
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

25 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

30 <400> 20

aagatcgcca aggtctcaa gaaccccaag ttccagcattc tgaccgtgaa caatgacatc 60

accctgctga agctg 75

35 <210> 21
<211> 72
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

40 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

45 <400> 21

gccacacactg cccgctctc ccagacagt tccgcccgt gcctgcccag cgccgacgac 60

gacttccccg cg 72

50 <210> 22
<211> 72
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

55 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

60 <400> 22

	gggacactgt gtgccaccac aggctggggc aagaccaagt acaacgccaa caagacccct	60
5	gacaagctgc ag	72
	<210> 23	
	<211> 72	
	<212> DNA	
10	<213> künstliche Sequenz	
	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
15	<400> 23	---
	caggcagccc tgcccttcgtt ccataatgcc gaatgcaaga agtcctgggg ccgcccgcatt	60
20	accgacgtga tg	72
	<210> 24	
	<211> 69	
	<212> DNA	
25	<213> künstliche Sequenz	
	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
30	<400> 24	
	atctgtgccc gggccagtgg cgtctccctcc tgcattggcg actctggcgg tccccctggtc	60
35	tgcctaaaag	69
	<210> 25	
	<211> 72	
	<212> DNA	
40	<213> künstliche Sequenz	
	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
45	<400> 25	
	gatggaggct ggaccttggt gggcatttg tcctggggca gcgacacctg ctccacccctcc	60
	agccctggcg tg	72
50	<210> 26	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> künstliche Sequenz	

5 <220>
10 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
15 <400> 26
 tacggccgtg tcaccaagct cataccttgg gtgcagaaga tcctggctgc caac 54
20 <210> 27
25 <211> 30
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz
30 <220>
35 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
40 <400> 27
 caggccgctg agcacagggt ggatggcgaaa 30
45 <210> 28
50 <211> 30
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz
55 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
 <400> 28
 gccgggtttg tcctgcaggg acacctgccaa 30
55 <210> 29
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz
60 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
65 <400> 29
 gtcggagggtg cggaccccgca gatgggcagc 30
70 <210> 30
75 <211> 30
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz
80 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

5 <210> 35
<211> 30
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

10 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

15 <400> 35

gggccaggct ccatccttt ggcagaccag 30

20

25 <210> 36
<211> 30
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

30 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

35 <400> 36

ggtgacacgg gcgtacacgc cagggctgga 30

40 <210> 37
<211> 26
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

45 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

50 <400> 37

ggaaattcca tatggcttc ctctgg 26

55 <210> 38
<211> 27
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

60 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

65 <400> 38

ccgctcgagt tggcagccag gatcttc 27

70 <210> 39
<211> 643

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

5 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

 <400> 39

 10 ttccctcta gaaataattt tggtaactt taagaaggag atatcatatg agtgctggta 60

 ttaactacgt gcaaaaactac aacggcaacc ttgctgattt cacctatgac gagagtgcgg 120

 15 gaacatttc catgtactgg gaagatggag tgagctccga cttgtcggtt ggtctgggct 180

 ggaccactgg ttcttcgaat gctatcagct actctgccga atacagtgtct tctggctcct 240

 cttcctacct cgctgtgtac ggctgggta actatccca ggcgaataac tacatgtcg 300

 20 aggattacgg tgattacaac cttgcagct cggccacaag ctttgttacc gtgtactctg 360

 atgaaagcac ctaccaagtc tgcaccgaca ctcgaactaa cgaaccatcg atcacggaa 420

 25 caagcacgtt cacgcagttac ttctccgttc gagagagcac ggcgcacatct ggaacggta 480

 ctgttgccaa ccatttcaac ttctggccc agcatgggtt cggaaattcc gacttcaatt 540

 atcaggcat ggcagtggaa gcatggagcg gcgcggcag cgccagtgtc acgatctct 600

 30 ctaaactcga gcaccaccac caccaccact gagatccggc tgc 643

<210> 40

<211> 643

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

35 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA

 <400> 40

 40 aaagggagal ctttattaaa acaaattgaa attcttcctc tatagtatac tcacgaccat 60

 aattgatgca cgtttgatg ttgccgtgg aacgactaaa gtggatactg ctctcacggc 120

 cttgtaaaag gtacatgacc ctctcacctc actcgaggct gaaacagcaa ccagacccga 180

 45 cctggtgacc aagaagctt cgtatgtcgta tgagacggct tatgtcacga agaccgagga 240

 gaaggatgga ggcacacatg ccgacccaaat tgataggagt ccgacttatg atgttagcagc 300

 tcctaattgcc actaatgttg ggaacgtcgaa gccgggtttc ggaaccatgg cacatgagac 360

	tacccatgt gatggtttag acgtggctgt gagcttgatt gctggtagc tagtgcctt	420
5	gttcgtcaaa gtgcgtcatg aagaggcaag ctctctgt cgctgtaga cctgccact	480
	gacaacgggt ggtttttt aagacccggg tcgtacccaa gcccttaagg ctgaagttaa	540
10	tagtccagta ccgtcacctt cgtacctcgc cgccggccgtc gcggtcacag tgctagagga	600
	gatttgagct cgtgggtgt gtgggtgtga ctctaggccc acg	643
15	<210> 41	
	<211> 861	
	<212> DNA	
	<213> künstliche Sequenz	
20	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA	
	<400> 41	
25	ttaacttaa gaaggagata tacatatggc tttcccttgg ctcccttcct gctggggccct	60
	cctgggtacc accttcggct gcggggtccc cgccatccac cctgtgtca gcggccgtc	120
	ccgcatcgta aatggggagg acgcccgtccc cggctcctgg ccctggcagg tgtccctgca	180
30	ggacaaaacc ggcttccact tctgcgggggg ctccctcatc agcgaggact ggggtggtcac	240
	cgctgcccac tgcggggtcc gcacctccga cgtggtcgt a gctggtagt ttgtcaagg	300
	ctctgacgag gagaacatcc aggtcctgaa gatcgccaag gtctcaaga accccaagt	360
35	cagcattctg accgtgaaca atgacatcac cctgtgtcaag ctggccacac ctgcccgtt	420
	ctccccagaca ggttccggcc tttgcctgcc cagcgccgac gacgacttcc cccggggac	480
40	actgtgtgcc accacaggct gggcaagac caagtacaac gccaacaaga cccctgacaa	540
	gctgcagcag gcagccctgc cccctctgtc caatgcccggaa tgcaagaagt cctggggccg	600
	ccgcatcacc gacgtgtatga tctgtgtccgg ggccagtggc gtctccctt gcatggcga	660
45	ctctggcggt cccctggctt gccaaaagga tggagcctgg accctggtgg gcattgtgtc	720
	ctggggcagc gacacctgct ccacctccag cccctggcgta tacgccccgtc tcaccaagct	780
50	cataccctgg gtgcagaaga tcttggtgc caacctcgag caccaccacc accaccactg	840
	agatccggct gctaacaag c	861

5 <210> 42
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz
 10 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
 <400> 42

15	aattgaaatt cttccttat atgtataccg aaaggagacc gaggagagga <u>cgacccggaa</u>	60
	ggacccatgg tggaagccga cgccccaggg gcggtaggtg ggacacgagt cgccggacag	120
	ggcgttagcac ttacccctcc tgcggcaggg gccgaggacc gggaccgtcc acagggacgt	180
20	cctgtttgg ccgaaggta agacgcccc gagggagtag tcgctcctga cccaccagtg	240
	gcgacgggtg acgccccagg cgtggaggct gcaccagcat cgaccactca aactagtcc	300
25	gagactgctc ctcttgtagg tccaggactt ctacgggttc cagaagtct tgggttcaa	360
	gtcgtaagac tggcacttgt tactgttagtgg gacgacttc gaccgggtg gacggcgaa	420
30	gagggtctgt cacaggcggc acacggacgg gtcgcggctg ctgctgaagg ggcgcctctg	480
	tgacacacgg tggtgccga ccccgctctg gttcatgttg cggttgtct gggactgtt	540
	cgacgtcgtc cgtcggtacg gggaggacag gttacggctt acgttctca ggacccggc	600
35	ggcgttagtgg ctgcactact agacacggcc ccggtcaccc cagaggagga cgtacccgct	660
	gagaccgcca ggggaccaga cgggttcctt acctcgacc tggaccacc cgtAACACAG	720
40	gaccccgctcg ctgtggacga ggtggaggac gggaccgcac atgcgggcac agtgggtcga	780
	gtatggaacc cacgttctt aggaccgacg gttggagctc gtgggttgg tgggtgtac	840
45	tctaggccga cgattgttc g	861

Patentansprüche

50 1. Verfahren zur Herstellung von DNA, das umfasst, daß man

- a) n einzelsträngige Basis-DNA-Oligonukleotide bereitstellt, die unmittelbar aufeinanderfolgende Teile der Nukleotidsequenz der herzustellenden DNA sind, wobei
 - i) das zweite bis n-te Basis-DNA-Oligonukleotid am 5'-Ende phosphoryliert ist und
 - ii) n wenigstens 2 ist;
- b) wenigstens (n-1) einzelsträngige Scharnier-DNA-Oligonukleotide bereitstellt, wobei für die Schar-

5 nier-DNA-Oligonukleotide gilt, daß der 3'-terminale Bereich eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids wenigstens teilweise komplementär zum 3'terminalen Bereich eines Basis-DNA-Oligonukleotids ist, und der 5'-terminale Bereich desselben Scharnier-DNA-Oligonukleotids wenigstens teilweise komplementär zum 5'-terminalen Bereich des unmittelbar darauffolgenden Basis-DNA-Oligonukleotids ist, so daß im Falle der Hybridisierung eines Scharnier-DNA-Oligonukleotids mit 2 unmittelbar aufeinanderfolgenden Basis-DNA-Oligonukleotiden ein im Bereich des Scharnier-DNA-Oligonukleotids doppelsträngiges DNA-Hybrid entsteht;

10 c) die Basis-DNA-Oligonukleotide mit den Scharnier-DNA-Oligonukleotiden in Kontakt bringt;
 d) das aus Schritt c) resultierende DNA-Hybrid einer Ligationsreaktion unterwirft;
 e) das Reaktionsprodukt aus Schritt d) einer Exonukleasereaktion unterwirft, wobei der durch ligierte Basis-DNA-Oligonukleotide gebildete DNA-Strang des Reaktionsprodukts aus Schritt d) wenigstens zwei Cap-Strukturen umfaßt.

15 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsprodukt aus Schritt e)** weiterhin einer PCR unterworfen wird.

20 3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, daß in der PCR ein erster Primer verwendet wird, dessen Zielsequenz im Bereich des ersten Basis-DNA-Oligonukleotids liegt, und ein zweiter Primer verwendet wird, dessen Zielsequenz im Bereich des n-ten Basis-DNA-Oligonukleotids liegt.**

25 4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet, daß in der PCR Primer eingesetzt werden, die eine oder mehrere Erkennungssequenzen für eine oder mehrere Restriktionsendonukleasen enthalten.**

30 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, daß das doppelsträngige Reaktionsprodukt der PCR weiterhin einem Restriktionsverdau unterworfen wird.**

35 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß die Ligationsreaktion mittels einer thermostabilen Ligase durchgeführt wird.**

40 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß die Ligationsreaktion mittels einer Ligase durchgeführt wird, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus T4-DNA-Ligase, Taq DNA-Ligase und Pfu DNA-Ligase.**

45 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß die Exonukleasereaktion mittels eines Enzyms durchgeführt wird, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Exonuklease VII, allgemein Exonukleasen, bevorzugt Exonuklease VII, jedoch auch Exonuklease I, Exonuklease III und Exonuklease V als auch DNase I sowie Mischungen der soeben beschriebenen Hydrolasen.**

50 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß die Cap-Struktur ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Thioatbindungen zwischen einzelnen Nukleotiden, 2'OMethyl-RNA, modifizierten Basen, DNA-Sequenzen mit Schleifenstruktur(en) und RNA-Sequenzen mit Schleifenstruktur(en).**

55 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß das erste Basis-DNA-Oligonukleotid eine Cap-Struktur umfaßt und das n-te Basis-DNA-Oligonukleotid eine Cap-Struktur umfaßt.**

60 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß die Basis-DNA-Oligonukleotide und/oder die Scharnier-DNA-Oligonukleotide durch die Phosphoramidit-Methode hergestellt werden.**

65 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Basis-DNA-Oligonukleotide und/oder Scharnier-DNA-Oligonukleotide randomisierte Nukleotide enthalten.**

70 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß die hergestellte DNA weiterhin in einen Vektor oder ein Plasmid kloniert wird.**

75 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, daß die hergestellte DNA oder der hergestellte Vektor oder das hergestellte Plasmid in eine Zelle eingeführt wird.**

14. DNA, erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13.

15. DNA nach Anspruch 14, hergestellt nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13.

5 **16.** DNA-Hybrid umfassend einen Einzelstrang, einen oder mehrere damit hybridisierende Scharnier-DNA-Oligonukleotide, eine Cap-Struktur im 5'-terminalen Bereich des Einzelstrangs und eine Cap-Struktur im 3'-terminalen Bereich des Einzelstrangs.

10 **17.** Kit zur Herstellung von DNA enthaltend ein erstes Basis-DNA-Oligonukleotid, das eine Cap-Struktur umfaßt, ein weiteres Basis-DNA-Oligonukleotid, das eine Cap-Struktur umfaßt, ein Enzym mit Ligaseaktivität und ein Enzym mit Exonukleaseaktivität.

15 **18.** Kit nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet, daß** es weiterhin Mittel zur Durchführung einer PCR enthält.

19. Kit nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet, daß** eine thermostabile DNA-Polymerase und Primer enthält, die eine oder mehrere Erkennungssequenzen für eine oder mehrere Restriktionsendonukleasen enthalten.

20

25

30

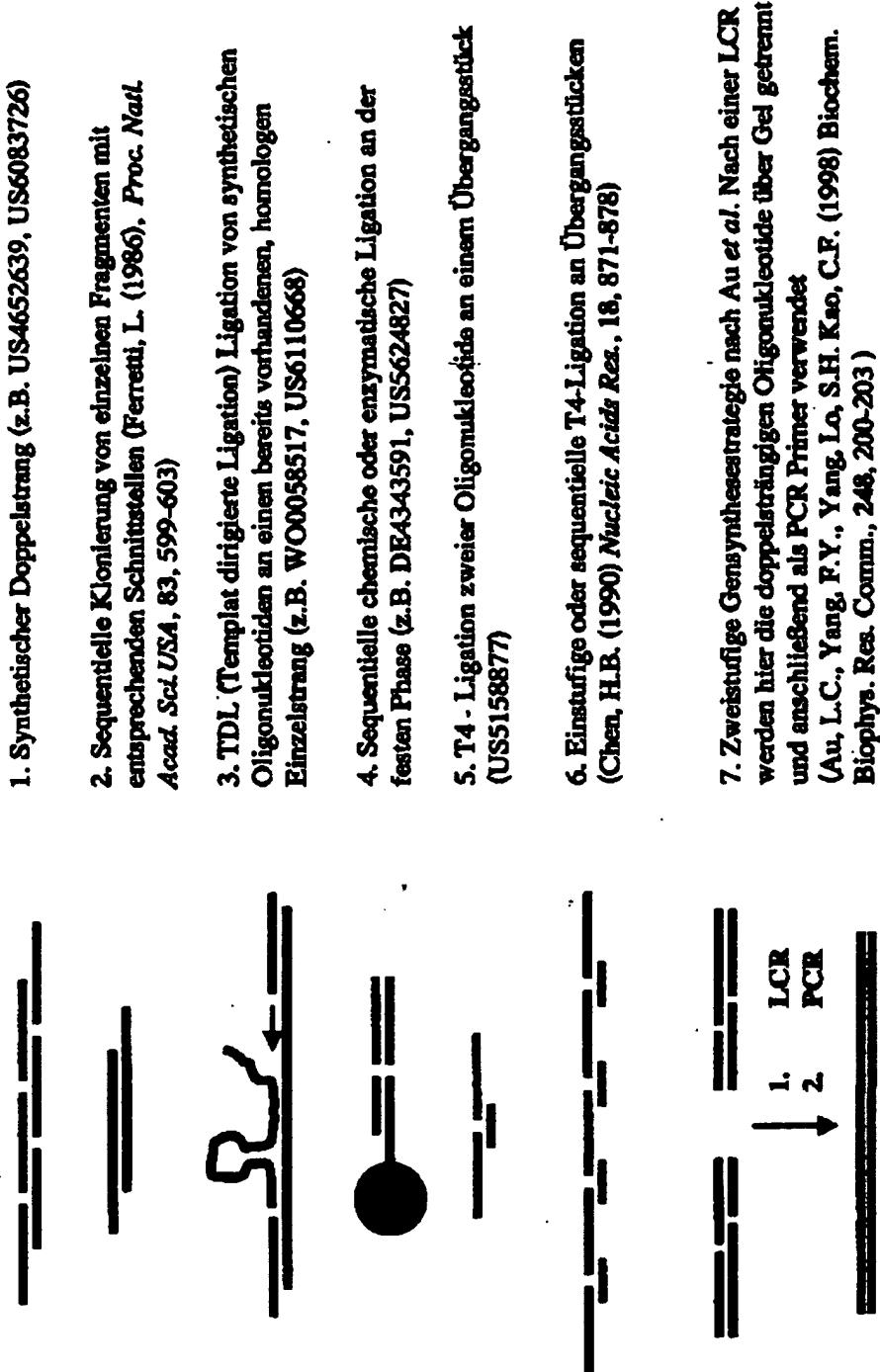
35

40

45

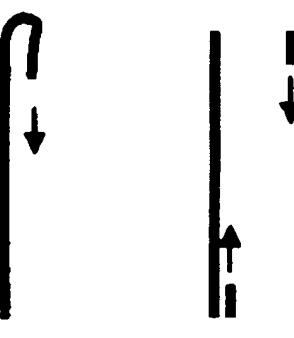
50

55

Figur 1A

Figur 1B

8. Synthetisches Oligonukleotid (140mer) mit Hairpin am 3'-Ende
(Uhmann, R. & Hein, F. (1987) *Nucleic Acids Symp Ser.*, 18, 237-240)



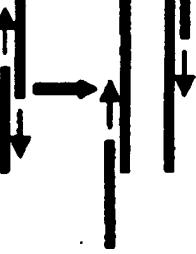
9. Synthese überlappender Oligonukleotide (Clecarelli, R.B. et al. (1991)
Nucl. Acids Res., 19, 6007-6013)



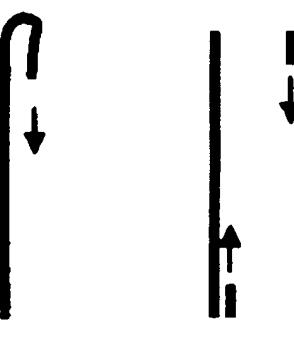
10. Rekursive PCR (Dillon, P.J. & Rosen, C.A. (1990) *BioTechniques*, 9, 298-300)

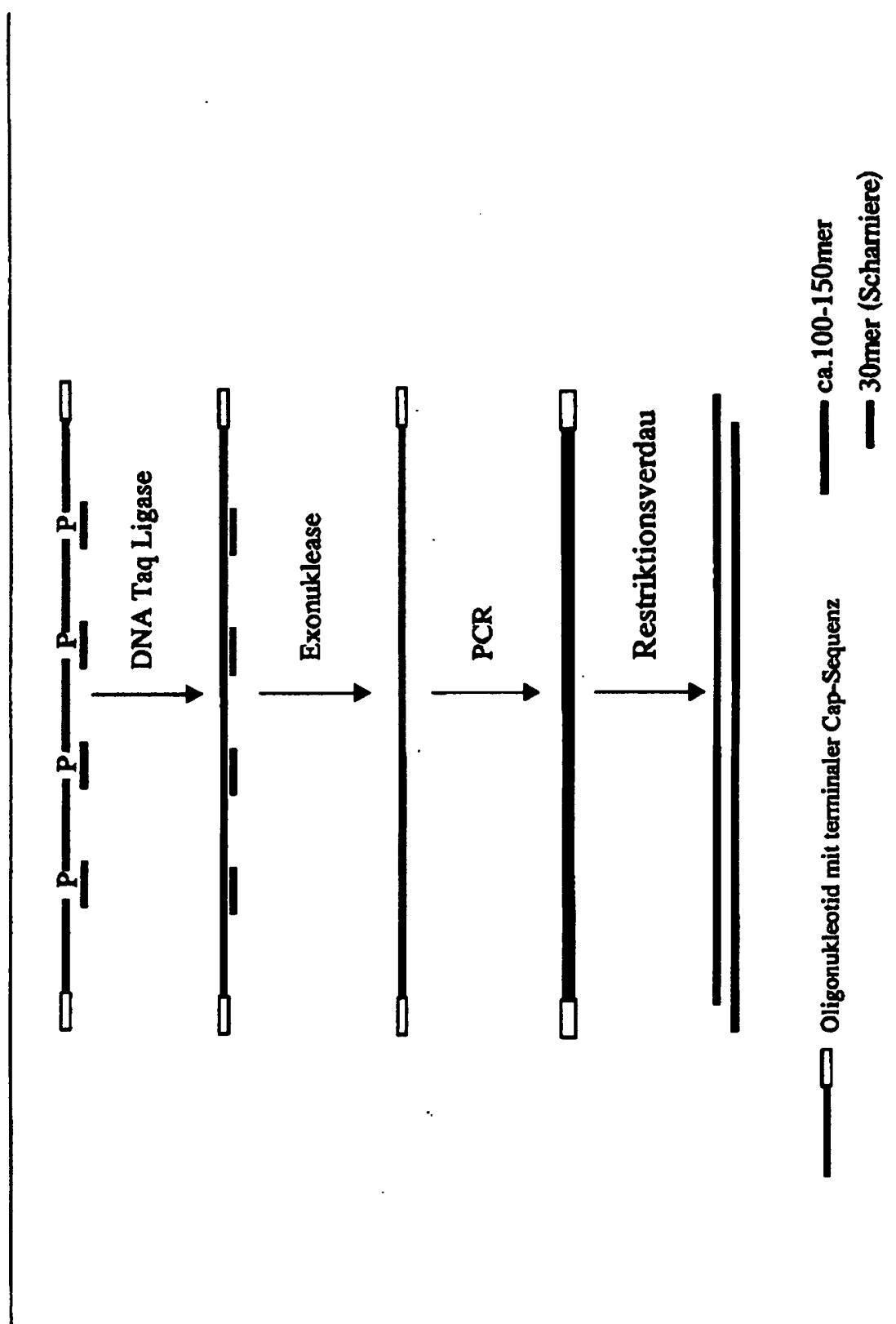


11. Doppelstrangsynthese durch PCR mit Übergangsstücken als Primern
(Yayarenan, K. & Puccini, C.J. (1992) *BioTechniques*, 12, 392-398)

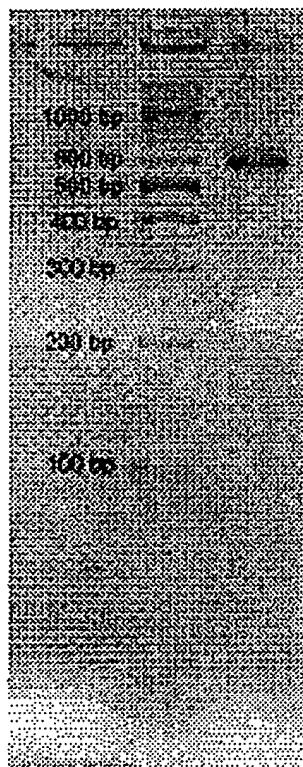


12. Sequentielle oder one-step Verlängerung von Oligonukleotiden
durch PCR (Casimiro, D.R. et al. (1997) *Structure*, 5, 1407-1412)



Figur 2

Figur 3



Figur 4A

FauNDI

XbaI Eco32I Ms1I BsaAI
ttccctctagaataatttgttaacttaagaaggagatcatatcagtgctggattaactacgtgaaa base pairs
aaaggagatcttattaaacaaattgaaattttatagataactcagaccataattgatgcacgtt 1 to 75

EcoRV NdeI
NdeI → Xylanase-Gen

Esp1396I

Asp700I AccB7I
actacaacggcaaccttgcattcacctatgacagagactgcccgaacatttccatgtactggaaatggag base pairs
ttagtgttgcgttggaaacgactaaagtggatactgctcacggcgtgtaaaggatcatgacccttacac 76 to 150

XmnI PflMI
Van91I

Eco24I SstI AtsI Bsp119I
AspHI FrlOI AspI Csp45I Mva1269I
Ecl136II BanII SfU1 Bpu14I
tgagctccgacttgcgttgcgtggactggaccactggttctcgatgtactctggcaataca base pairs
actcgaggctgaaacagcaaccagccgacctggtaccaagaagcttacatgatgtcgatgagacggcttatgt 151 to 225

EcoICRI SacI Tth111I LspI BsmI
Bbv12I Alw21I BstBI BsaMI
Psp124BI BsiHKAI NspV

Bsu36I

Ksp632I HindII CvnI
BcgI BseRI HpaI Eco81I
gtgttctggctcccttcacccgtgtgtacggctgggttaactatccctcaggctgaaatactacatcg base pairs
cacaaagaccgaggagaaggatggagcgacacatggcggaccattatgataggatggactttagtgc 226 to 300

Eam1104I HincII Bse21I
EarI AocI

EcoT14I AccB1I

StyI Asp718I
EaeI Eco130I BshNI
aggattacggattacaaccctgcagctggccacaaggccttgcgttgcgtactctgtatggaaacccacc base pairs
tcctaattccactaatgttggaaacgtcgagccgggttgcggacatggcactacccgtggatgg 301 to 375

CfrI ErhI BanI KpnI
BssT1I Acc65I
Eco64I

BspXI ClaI
Bsp106I BanIII Eco255I
BsgI BscI Acc113I
aagtctgcaccgacactcgaactaacgaaccatcgatcacggaaacaaggcacttgcgtacttccgttc base pairs
ttcagacgtggctgtgagcttgcgttagctagtgccttgcgtgcaagtgcgtcatgaaggaggcaag 376 to 450

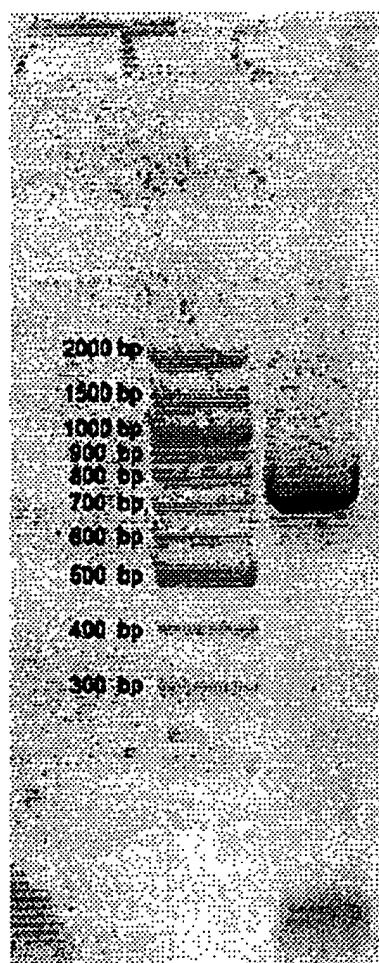
BspDI BseCI ScaI
Bsa29I
BscI Bsu15I

Figur 4B

Alw21I BanII
 AspHI Eco24I ApoI
 Bsp120I AcsI
 gagagagcacgcgcacatctggAACGGTgactgttgccaaaccattcaacttctggggccAGCATGGTTGGGA base pairs
 ctctctcgtagacccggcactgacaACGGTTGGTAAGTTGAAGACCCGGTCGTAACCAAGCCCT 451 to 525
 Bbv12I PspOMI EcoRI
 BsiHKAI FriOI
 MsI ApaI
 AccB1I Hsp92I MroNI Cfr10I NaeI
 KasI Hin1I BstD102I Bse118I HaeII
 Eco64I BbiIII AcyI BsrFI BstH2I
 attccgacttcaattatcaggcatggcagtggAAAGCATGGAGCGGCCGCAGCGCCAGTGTACAGATCTCCT base pairs
 taaggctgaagttaatagtccagtaccgtcaccttcgtacacctcgccgcggcgtcgccgtcacagtgtctagagga 526 to 600
 BanI BsrBI NarI NgoMI HaeII Bsp143II
 BshNI Msp17I EheI NgoAIV BbeI
 AccBSI BsaHI BssAI Bsp143II BstH2I
 XhoI PaeR7I
 Sfr274I BsiHKAI MfII
 BseRI Eco88I Alw21I BstYI
 ctaaactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgc base pairs
 gattttagctcggtgggtgggtgactctaggccgacg 601 to 643
 AvaI AspHI BstX2I
 Ama87I Bbv12I XhoII
 BcoI BsoBI
 →! Ende Xylanase-Gen im Anschluss (His)₆-Tag

Sequenz 1 Xylanasesequenzierung aus pET23a.

Figur 5



Figur 6A

Eco24I Asp718I
 EcoO109I BanI KpnI
 FaNDI BseRI Bsp120I Eco64I
 ttaactttaagaaggagatatacatatggctttccctctggctcctctgtctggcccttcgttaccaccc base pairs
 aattgaaattttccatatatgtataccgaaaggagaccgaggagaggacgaccggaggacccatgtggaa 1 to 75
 NdeI PspOMI BanII AccB1I
 DraII ApaI BshNI
 PpuMI FriOI Acc65I

Bsp1720I BsaHI
 DraIII CeliI BsiHKAI BbiII AtsI
 PpuMI DraIII Bbv12I HinII AspI
 cggtcgccccatccaccctgtgcgtcgccgtccatgtgaatggggaggacgcgtccc base pairs
 gcccacgccccagggcggttaggtggacacgactcgccgacagggcgtagcacttaccctctgcggcagg 76 to 150
 EcoO109I Bpu1102I MspA1I Msp17I
 Psp5II BlpI Alw21I Hsp92I
 AspHI NspBII AcyI Tth111I

SbfI Cfr10I
 BstSFI BsrFI BanII
 BspMI Sse8387I Eco24I
 cggctctggccctggcagggtgcctcgaggacaaaaccggcttccacttctgcggggctccatcagcga base pairs
 gccgaggaccgggaccgtccacagggacgtcctgtttggcaaggtaagacgccccgaggagtagtcgt 151 to 225
 SfcI BssAI FriOI
 PstI Bse118I

Eco065I AtsI Ksp22I
 BstEII Tth111I FbaI
 DrdI NspBII ggactgggtgtcacggctgcccactgcgggtccacccgtggctgttagctgttagttgtcaagg base pairs
 cctgaccaccagggtggcgtggacgggtgacgccccaggcgtggaggctgaccacatcgaccactcaaactgttcc 226 to 300
 Eco91I MspA1I AspI BclI
 BstPI
 PspEI

AlwNI BssT1I BsaMI
 DraII ErhI BbsI BsmI
 BseRI PpuMI Eco57I BpuAI
 ctgtgacggaggagaacatccagggtcctgaagatcgccaaagggtttcaagaaccccaagttcagcatttgcgtt base pairs
 gagactgctcccttgttaggtccaggactttagcggttccagaagttctgggttcaagtgtaaactggca 301 to 375
 EcoO109I Eco130I Bbv16II Mva1269I
 Psp5II StyI BpiI
 EcoT14I

MluNI AtsI
 CfrI Tth111I
 Eco57I BspMI
 gaacaatgacatcaccctgtgaagctggccacacctgcccgttctccacagacagtgtccggcgtgtgcctgcc base pairs
 cttgttactgttagtggacacttcgaccgggtgtgacgggcaagagggtctgtcacaggcggcacacggacgg 376 to 450
 EaeI AspI
 MscI
 BalI

Figur 6B

BstH2I	NspBII	KspI SacII	Esp1396I
Bsp143II	BstDSI Cfr42I DraIII	AccB7I	
HaeII	DsaI SstII	PflMI	
	MspA1I	Van91I	
	Sfr303I		
cagcgccgacgacttccccggggacactgtgtgccaccacaggctggggcaagaccaagtacaacgcca base pairs gtcgcggctgctgtaaggggcgcgggtgacacacgggtgggtccgacccggttcatgtgcgg 451 to 525			
PstI BsaMI			
SfcI		BsmI	
caagaccctgacaagctgcagcaggcagccctgcccctctgtccaatgccaatgcagaaggcttcggggccg base pairs gttctgggactgttcgacgtccgtcggacggggaggacaggtaacggttacgttctcaggacccggc 526 to 600			
BstSFI		Mva1269I	
BsaHI			
MslI	BbiII Esp3I	Hin1I BsmBI	
ccgcattaccgacgtgatctgtccggggccactggcgtccctctgtcatggcgactctggcggtccct base pairs ggcgtagtggctgactactagacacggccgggtcaccgcagaggaggacgtacccgctgagaccggcagg 601 to 675			
	Msp17I BseRI		
	Hsp92I		
	AcyI		
BstXI BspMI			
ggctgc当地aggatggggccctgggtggcattgtgtccctggcagcgacacctgtccacccatggc base pairs ccagacgggtttctacctggaccctggaccacccgttaacacaggacccggctgtggacgagggtggagg 676 to 750			
EcoT14I XhoII Eco88I Bbv12I			
GsuI	StyI BstX2I	XhoI PaeR7I	
ccctggcgttacgcccgttaccaagctcataccctgggtcagaagatccggctgccaacccgtggacca base pairs gggaccgcacatgcggcacagtgggtcgagtatggggacccacgttcttaggaccggacgggtggagg 751 to 825			
BpmI	ErhI BstYI	Ama87I AspHI	
	BssT1I Mf1I	BcoI BsoBI	
		AvaI Alw21I	
Mf1I			
BstYI			
ccaccaccaccactgagatccggctgctaacaaggc base pairs ggtgtgggtgactctaggccgacattttcg 826 to 861			
BstX2I			
XhoII			

Sequenz 2 Chymotrypsinogen A Sequenzierung aus pET23a.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 02 00 0720

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	WO 01 57269 A (ILLUMINA INC) 9. August 2001 (2001-08-09)	1-3, 6-12, 15-17	C12N15/10 C12N15/11 C12P19/34
Y	* Seite 17, letzter Absatz - Seite 19, erster Absatz; Seite 23 zweiter Absatz - fünfter Absatz; Abbildung 8 *	4,5,13, 14,20	
X	---		
X	WO 00 63437 A (ILLUMINA INC) 26. Oktober 2000 (2000-10-26)	1-3, 6-12, 15-17	
Y	* Seite 24, Zeile 20 - Seite 26, Zeile 7; Seite 34, Zeile 22 - Seite 35, Zeile 33; Seite 64, Zeile 1 - Zeile 12; Seite 68, Zeile 25 - Seite 69, Zeile 18; Abbildung 3 *	4,5,13, 14,20	
X	---		
X	WO 94 03636 A (ABBOTT LAB) 17. Februar 1994 (1994-02-17) * Seite 18, Zeile 17 - Seite 21, Zeile 27; Seite 25, Zeile 1 - Zeile 8; Ansprüche 49-55 *	1,6-12, 15-19	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
X	WO 96 15271 A (ABBOTT LAB) 23. Mai 1996 (1996-05-23)	1-3, 6-12, 15-19	C12N C12P C12Q
	* Seite 12, Zeile 8 - Seite 14, Zeile 28; Seite 17, Zeile 35 - Seite 18, Zeile 14; Seite 22, Zeile 12 - Zeile 19; Ansprüche 5, 6 und 9; Abbildungen 1 und 3 *		

		-/-	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
MÜNCHEN	28. Mai 2002	Sommer, B	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze		
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		
A : technologischer Hintergrund	D : in der Anmeldung angeführtes Dokument		
O : nichtschriftliche Offenbarung	L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument		
P : Zwischenliteratur	& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	EP 0 585 660 A (BECTON DICKINSON CO) 9. März 1994 (1994-03-09) * Seite 3, Zeile 51 - Seite 4, Zeile 46; Ansprüche 1-5 *	1,2,6-9, 11,12, 15,16	
X	JAYARAMAN K ET AL: "A PCR-mediated gene synthesis strategy involving the assembly of oligonucleotides representing only one of the strands" BIOTECHNIQUES, Bd. 3, Nr. 12, 1992, Seiten 392-398, XP001057259 ISSN: 0736-6205	15,16	
Y	Zusammenfassung; Seite 394, Spalte 2, zweiter Absatz - Seite 396, Spalte 3, zweiter Absatz;	1-14, 17-20	
X	---		
X	MEHTA DEEPA V ET AL: "Optimized gene synthesis, high level expression, isotopic enrichment, and refolding of human interleukin-5." PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, Bd. 11, Nr. 1, 1997, Seiten 86-94, XP002199111 ISSN: 1046-5928	15,16	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
Y	Zusammenfassung; Abbildung 2; Seite 87, linke Spalte, letzter Absatz - Seite 89, linke Spalte, erster Absatz	1-14, 17-20	
X	---		
X	EP 0 744 470 A (JOHNSON & JOHNSON CLIN DIAG) 27. November 1996 (1996-11-27)	15,16	
Y	* Ansprüche *	1-14, 17-20	

Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
MÜNCHEN	28. Mai 2002	Sommer, B	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 02 00 0720

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

28-05-2002

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0157269	A	09-08-2001	AU	3806701 A	14-08-2001
			AU	3806801 A	14-08-2001
			WO	0157268 A2	09-08-2001
			WO	0157269 A2	09-08-2001
			US	2002006617 A1	17-01-2002
WO 0063437	A	26-10-2000	US	6355431 B1	12-03-2002
			AU	4476900 A	02-11-2000
			EP	1196630 A2	17-04-2002
			WO	0063437 A2	26-10-2000
WO 9403636	A	17-02-1994	AU	4687393 A	03-03-1994
			CA	2140331 A1	17-02-1994
			DE	69329824 D1	08-02-2001
			DE	69329824 T2	09-08-2001
			EP	0654093 A1	24-05-1995
			ES	2154648 T3	16-04-2001
			JP	8501212 T	13-02-1996
			US	5516663 A	14-05-1996
			WO	9403636 A1	17-02-1994
			US	5573907 A	12-11-1996
WO 9615271	A	23-05-1996	WO	9615271 A1	23-05-1996
EP 0585660	A	09-03-1994	CA	2101119 A1	18-02-1994
			DE	69328524 D1	08-06-2000
			DE	69328524 T2	31-08-2000
			EP	0585660 A2	09-03-1994
			JP	2018637 C	19-02-1996
			JP	6165678 A	14-06-1994
			JP	7057187 B	21-06-1995
EP 0744470	A	27-11-1996	AU	5233996 A	05-12-1996
			CA	2176193 A1	23-11-1996
			CN	1140762 A	22-01-1997
			EP	0744470 A1	27-11-1996
			JP	9107997 A	28-04-1997
			NO	962062 A	25-11-1996
			ZA	9604057 A	21-11-1997

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.